

Syntetyczny opis wyników uzyskanych w pierwszym roku realizacji projektu
„Analiza zmienności epigenetycznej indukowanej stresem suszy oraz ocena jej stabilności transgeneracyjnej w aspekcie tolerancji jęczmienia na stres niedoboru wody”
wykonywanego w ramach programu ‘Postęp biologiczny w produkcji roślinnej’ MRiRW

Odpowiedź roślin na stres niedoboru wody jest procesem wysoce złożonym, regulowanym wielokierunkowo, prowadzącym do istotnych zmian molekularnych, biochemicznych oraz fizjologicznych, a w konsekwencji także morfologicznych. Dane literaturowe, jak również badania prowadzone do tej pory przez nasz zespół badawczy w ramach projektów POLAPGEN-BD i EUROOT, wskazują na znaczną reorientację transkryptomu jęczmienia pod wpływem niedoboru wody. Co istotne, obserwowane zmiany w profilach transkryptomów roślin narażonych na stres suszy mogą być regulowane zmianami w profilach metylacji DNA, jednak dotychczas epigenetyczne mechanizmy regulacji odpowiedzi na stres niedoboru wody u jęczmienia nie były badane i ich rola w tolerancji stresu suszy, a tym bardziej w adaptacji do niekorzystnych warunków środowiskowych jest nieznana.

Metylacja cytozyny jest modyfikacją DNA odgrywającą istotną rolę w regulacji ekspresji genów. Całościowy profil metylacji cytozyny w genomie, określany jako metylom DNA, może ulegać zmianom o charakterze dziedzicznym lub niedziedzicznym, określanym zbiorczo jako zmiany epigenetyczne w DNA. Indukowane czynnikami stresowymi zmiany epigenetyczne, a w konsekwencji zmiany w aktywności transkrypcyjnej genów, odgrywają istotną rolę w procesie odpowiedzi roślin na niekorzystne warunki środowiskowe. Nieliczne prace wskazują, że zmiany w metylacji DNA mogą służyć nie tylko krótkoterminowej odpowiedzi na stres, ale także mogą być stabilne długoterminowo, podlegając utrwaleniu zaindukowanych profili metylacji podczas podziałów mitotycznych i mejotycznych. Skutkować to może dziedziczeniem profili metylacji w kolejnych pokoleniach.

Długoterminowym celem wieloletniego projektu jest weryfikacja hipotezy zakładającej, że zmiany w metylacji DNA indukowane podczas stresu suszy u jęczmienia mogą mieć pozytywną wartość przystosowawczą. W pierwszym roku badań realizowano trzy tematy badawcze.

1. Indukcja epialleli metylacyjnych w stresie suszy w dwóch stadiach rozwojowych jęczmienia (stadium 14-dniowej siewki i stadium strzelania w źdźbło) oraz globalna analiza transkryptomu analizowanych roślin z wykorzystaniem metody RNA-Seq (pokolenie EPI₀).

Celem tematu badawczego 1 było wyindukowanie nowych profili metylacyjnych w tkankach jęczmienia poprzez zastosowanie stresu suszy w dwóch stadiach rozwojowych: 1) w stadium 14-dniowej siewki, oraz osobno 2) w stadium strzelania w źdźbło. Dodatkowo, aby określić wyjściowy stan transkryptomu roślin w układzie eksperymentalnym oraz zmiany w transkrypcyjnym zachodzące pod wpływem stresu suszy, celem była globalna analiza transkryptomu analizowanych roślin z wykorzystaniem metody RNA-Seq.

W wyniku realizacji zadania badawczego 1 uzyskano nasiona pochodzące z 9 indywidualnych roślin niepoddawanych stresowi suszy, nasiona 12 roślin poddanych stresowi suszy w stadium 14-dniowej siewki oraz nasiona 12 indywidualnych roślin poddanych stresowi suszy w stadium strzelania w źdźbło. 12 analiz transkryptomu przeprowadzonych metodą RNA-Seq.

Przeprowadzone analizy umożliwiły wyprowadzenie roślin poddanych stresowi suszy i roślin rosnących w warunkach kontrolnych, oraz uzyskanie nasion tych roślin do analiz molekularnych i fizjologicznych w kolejnym pokoleniu. Ponadto, przeprowadzone badania analiz transkryptomu liścia z wykorzystaniem metody RNA-Seq umożliwiły skatalogowanie genów ulegających ekspresji w drugim liściu siewek jęczmienia rosnących w warunkach kontrolnych oraz ulegających zróżnicowanej ekspresji

w stosunku do warunków kontrolnych po hodowli w warunkach niedoboru wody oraz po późniejszym okresie 14 dni ponownej rehydratacji i przywróceniu optymalnych warunków wzrostu roślin. Przeprowadzone analizy stanowią punkt wyjścia dla badań mających na celu określenie wpływu stresu suszy na przygotowanie kolejnych pokoleń roślin, będących potomstwem roślin, które przeżyły stres suszy, na przystosowanie do warunków stresu. Dodatkowo, przeprowadzone badania, dzięki zastosowaniu najnowszej technologii analiz transkryptomu (RNA-Seq) dają nowe informacje nt charakterystyki zmian molekularnych zachodzących na poziomie transkryptomu podczas stresu suszy u jęczmienia.

2. Analizy fizjologiczne roślin pokolenia EPI₀ podczas stresu suszy

Celem tematu badawczego 2 była charakterystyka parametrów fizjologicznych roślin rosnących w warunkach kontrolnych oraz charakterystyka i ocena zmian parametrów fizjologicznych i fenotypowych zachodzących pod wpływem stresu suszy u analizowanych roślin.

Przeprowadzone analizy dotyczyły oceny względnej zawartości wody (RWC) podczas stresu suszy w dwóch stadiach rozwojowych, analiz fluorescencji chlorofilu oraz sprawności fotosystemu II (PSII) podczas stresu suszy oraz fenotypowania parametrów wzrostu roślin podczas eksperymentu i cech struktury plonu. Uzyskane wyniki wskazują na znaczne obniżenie sprawności fotosyntezy podczas suszy w stadium strzelania w źdźbło, w stosunku do stadium dwutygodniowej siewki mimo, iż względna zawartość wody w liściach w tym stadium była wyższa o około 10%. Zaobserwowano, że stres suszy wpływa negatywnie zarówno na reakcje jasne, jak i ciemne, gdyż wartości współczynników określających stan podstawowych reakcji fotochemicznych ($\Phi_{Po}/(1 - \Phi_{Po})$) oraz reakcji termicznych, niezależnych od światła ($\Phi_{Po}/(1 - \Phi_{Po})$) ulegają istotnemu obniżeniu, co może być wynikiem uszkodzeń w fotosystemie drugim. Wykazano zmniejszone prawdopodobieństwo przeniesienia elektronu na łańcuch przekaźników (Ψ_{Eo}) z jednocześnie zwiększoną wydajnością kwantową rozproszenia energii (Φ_{Do}). Większa ilość energii rozproszona w postaci ciepła jest konsekwencją obniżonej sprawności fotosyntetycznej. W trakcie przeprowadzonych traktowań stresem niedoboru wody, wartość tego wskaźnika wyraźnie spadła, wskazując na stan stresu znacznie obniżającego funkcjonowanie fotosyntezy w analizowanych roślinach. Analiza fenomenologicznych przepływów energii wykazała między innymi inaktywację części centr reakcyjnych fotosystemu drugiego. Zmniejszenie ilości aktywnych centr reakcyjnych, wpływa na zwiększony przepływ energii przez pojedyncze centrum reakcyjne zobrazowane poprzez zwiększenie wartości parametrów absorpcji energii świetlnej (ABS/RC), ilości rozproszonej energii (DIO/RC), ilości energii związanej (TRO/RC) oraz ilości energii wykorzystanej na transport elektronów (ETO/RC) przez pojedyncze centrum reakcyjne. Ze względu na znacznie mniejszą ilość aktywnych centr reakcyjnych w liściach roślin poddanych suszy późnej, wartości tych wskaźników były proporcjonalnie wyższe.

Przeanalizowane cechy struktury plonu wskazują na istotny wpływ stresu niedoboru wody w obydwu stadiach na rozwój i plonowanie jęczmienia. Obniżeniu uległy między innymi takie parametry, jak: sucha masa pędów, liczba kłosów, plon oraz masa 1000 ziaren. Można wysnuć wniosek, iż stres niedoboru wody nawet zadany na bardzo wczesnych etapach rozwojowych i po pełnym powrocie do prawidłowych warunków nawodnienia i parametrów fizjologicznych, istotnie wpływa na cechy agronomiczne. Z drugiej strony, stres suszy zadany w późnych stadiach rozwojowych, kiedy to zapotrzebowanie na wodę jest wyraźnie wyższe, silnie wpływa na rozwój jęczmienia poprzez zaburzenia w rozwoju kłosa, wytworzenie wielu nowych, ale niekłosonośnych pędów, co drastycznie obniża wiele cech agronomicznych.

3. Analizy profilu metylacji DNA roślin jęczmienia pokolenia EPI₀ podczas stresu suszy przeprowadzane na poziomie genomowym z wykorzystaniem metody RRBS (Reduced Representation Bisulfite Sequencing).

Celem tematu badawczego 3 było uzyskanie i charakterystyka precyzyjnych profili metylacji DNA w genomie jęczmienia. Analizy metylomu DNA umożliwiły określenie stanu wyjściowego roślin rosnących w warunkach optymalnych w stadium 14-dniowej siewki oraz umożliwiły identyfikację i charakterystykę zmian w transkryptomie zachodzących pod wpływem stresu suszy.

Przeprowadzone analizy metylomu badanych roślin z wykorzystaniem techniki RRBS (Reduced Representation Bisulfite Sequencing), pozwoliły na zsekwencjonowanie reprezentatywnej części metylomu jęczmienia, obejmującej ok 5% sekwencji genomowej. Przeprowadzone analizy umożliwiły scharakteryzowanie metylomu liścia siewek jęczmienia rosnących w warunkach kontrolnych, poddanych stresowi suszy oraz roślin, które po okresie suszy hodowane były ponownie w optymalnych warunkach wzrostu.

Uzyskane wyniki, po zakończeniu analiz bioinformatycznych, korelowane będą z wynikami analiz transkryptomu i wynikami analiz fizjologicznych, w celu określenia korelacji pomiędzy zmianami na poziomie metylomu, wywołanymi stresem suszy, oraz ich wpływem na obserwowane zmiany w ekspresji genów i zmiany na poziomie fizjologicznym. Dzięki temu możliwe będzie opracowanie referencyjnego zestawu informacji o sekwencji metylomu i stanu transkryptomu jęczmienia, do których odnoszone będą wyniki analiz metylomu i transkryptomu roślin, będących potomstwem roślin, które przeszły stres suszy w bieżącym roku w ramach sprawozdawanego projektu.